

FROZEN FOOD WITH ANTIFREEZE PEPTIDES**Patent number:** JP2000515753T**Publication date:** 2000-11-28**Inventor:****Applicant:****Classification:****- international:** A23G9/04; A23G9/02**- european:** A23G9/02; A23G9/02K; A23J1/00F2; A23L3/37;
C07K14/415; C12N15/82C8B2**Application number:** JP19980508419T 19970704**Priority number(s):** WO1997EP03636 19970704; EP19960305497
19960726; EP19960305499 19960726**Also published as:**

WO9804147 (A1)

BR9710520 (A)

TR9900146T (T2)

AU720396 (B2)

Report a data error here

Abstract not available for JP2000515753T

Abstract of corresponding document: **WO9804147**

A process for the production of a frozen food product comprising AFP, wherein the conditions are chosen such that the ice-crystals in the product have an aspect ratio of from 1.1 to 1.9.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

PL-9028 4/9

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-515753

(P2000-515753A)

(43) 公表日 平成12年11月28日 (2000.11.28)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

キーワード (参考)

A 2 3 G 9/04

A 2 3 G 9/04

9/02

9/02

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願平10-508419
 (86) (22) 出願日 平成9年7月4日 (1997.7.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成11年1月7日 (1999.1.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP97/03636
 (87) 国際公開番号 WO98/04147
 (87) 国際公開日 平成10年2月5日 (1998.2.5)
 (31) 優先権主張番号 96305497.8
 (32) 優先日 平成8年7月26日 (1996.7.26)
 (33) 優先権主張国 ヨーロッパ特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 96305499.4
 (32) 優先日 平成8年7月26日 (1996.7.26)
 (33) 優先権主張国 ヨーロッパ特許庁 (EP)

(71) 出願人 ユニリーパー・ナームローゼ・ベンノー
 ト・シャープ
 オランダ国、3013・エイエル・ロッテルダ
 ム、ヴェーナ 455
 (72) 発明者 フェン、リチャード・アンソニー
 英国、シャーンブロック・エムケイ44・1
 エルキュー、ユニリーパー・ハウス、ユニ
 リーパー・リサーチ・コロワース・ラボラ
 トリー (番地なし)
 (74) 代理人 弁理士 山崎 行造 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 不凍ペプチドを含む冷凍食品

(57) 【要約】

A F P を含む冷凍食品の製造方法であって、食品中の氷
 結晶が1.1乃至1.9の縦横比を有するように、条件が
 選択される、方法。

【特許請求の範囲】

1. AFPを含む冷凍食品の製造方法であって、食品中の氷結晶が1.1乃至1.9の縦横比を有するように条件を選択する、方法。
2. 縦横比に影響する条件が、冷凍速度、冷凍の間の製品の可動性、貯蔵温度及び時間、製品の配合及びAFP類の性質及び量、及びこれらの組み合わせから選択される、請求項1記載の方法。
3. 冷凍食品が冷凍菓子製品である、請求項1記載の方法。
4. 0.0001乃至0.5重量%のAFP類を含む冷凍菓子製品であって、前記冷凍菓子製品が1.1乃至1.9の縦横比の氷結晶を有する、冷凍菓子製品。
5. AFP類が氷結晶の錐面へ好ましく結合する、請求項4記載の冷凍菓子食品。
6. 噛み応えの対比を有する冷凍菓子製品であって、前記冷凍菓子製品が、請求項4記載の冷凍菓子製品の分離要素を含む、冷凍菓子製品。
7. 薄いウォーターアイス層と交互に薄いアイスクリーム層を含み、ウォーターアイス層が、0.0001乃至0.5重量%のAFP類を含み、1.9乃至3.0の縦横比の氷結晶を有する、請求項6記載の冷凍菓子製品。
8. 請求項4記載の冷凍菓子製品の製造に使用するのに適するアイスクリーム・ミックス。
9. 製造に曝気及び静置冷凍を含む、請求項8記載のアイスクリーム・ミックス。

【発明の詳細な説明】

不凍ペプチドを含む冷凍食品

発明の技術分野

本発明は、AFP類を含む食品の製造方法、及びAFPを含む食品に関する。

発明の背景

食品の冷凍耐性を改良するために不凍ペプチド（AFP類）の使用が提案されている。

不凍タンパク質は、文献に記載されており、例えば、Marilyn Griffith及びK. Vanya Ewart著、Biotechnology Advances、V o 1 1 3、N o 3、3 7 5 頁乃至4 0 2 頁、1 9 9 5 年を参照のこと。不凍特性は、一般に、以下の特性、すなわち、温度ヒステシス、氷の再結晶の阻害、氷の結晶形の制御、及び氷の結晶核との相互作用などの特性の一つ以上を有する。

温度ヒステシスは、AFP類の最もよく知られた特性であり、この特性は、通常、AFP類の存在をテストするために使用される。温度ヒステシスは、融点に影響することなく、温度ヒステシス活性なAFPを含む溶液の見掛けの凝固点を低下させることからもたらされる。温度ヒステシス・テストによるAFP源の同定は、文献に広く知られており、例えばJohn G Duman著、Cryobiology 3 0、3 2 2 頁乃至3 2 8 頁（1 9 9 3）を参照のこと。

氷の再結晶の阻害は、AFP類のもう一つの特性である。この活性は、氷の結晶生長の抑制ともいわれる。この特性は、ある特定の時点でのAFPの存在下とAFPの非存在下での氷の結晶の大きさを比較することによりテストされる。魚のAFP類のテストでこの方法を使用することは、米国特許第5, 1 1 8, 7 9 2 号（DNA プラント・テクノロジー・コーポレーション（Plant Technology Corporation））に記載されている。

AFP類の第3の特性は、氷の結晶形に影響する能力である。この特性は、AFP類が氷の結晶の特定の表面へ選択的に結合することに由来し、したがって、

特定の方向への結晶の生長を制限する。そのため六方晶系両錐形を有する氷の結晶の存在は、AFPの存在を示すと考えられている。この方法は、例えば、国際

公開第92/22581号(ウォータロー大学(University of Waterloo))には、細胞外の冬ライ麦(ウインター・ライ(winter rye))のAFP類活性のテストについて記載されている。

AFP類の第4の特性は、氷の結晶核物質の活性を阻害する能力である。このAFPと氷の結晶核の間での相互作用は、例えば、増加した温度ヒステシスをもたらす。この特性は、例えば、国際公開第96/40973号(ノートル・ダム・ド・ラック大学(University of Notre dame du Lac))で、テストされている。

AFP類は、生成物の冷凍耐性を改良することを示唆している。これに関連して多くの適用が示唆されている。

例えば、AFP類は、生化学的な物質の低温保存を促進することが示唆されている(国際公開第91/12718号、アゴウロン・ファーマシューティカルズ(Agouron Pharmaceuticals)、国際公開第91/10361号、カリフォルニア大学評議員(The Regents of the University of California))。また、AFP類は、例えば、化粧品又は医薬品におけるリボソームの漏れを防ぐことが示唆されている(国際公開第96/20695号を参照のこと)。さらに可能性のある適用は、AFPを含ませる(又は、遺伝的に製造させる)ことにより植物の冷凍耐性を増大させることである(J.Cell.Biochem.Suppl.vol.14e、1990年、303頁、XP002030248、Leeら、要約R228を参照のこと)。魚のAFP類もまた、例えば、フローズン・ヨーグルト又はアイスクリームのような冷凍食品中に使用することが示唆されている(Pillsburyの米国特許第5,620,732号、及びHSCリサーチ・アンド・ディベロップメント・リミテッド・パートナーシップ(Research and development limited partnership)の国際公開第96/11586号)。

しかし、これまでにAFP類の使用は商業規模では適用されてなかった。本出願人は、多くのAFP類が記載されているにもかかわらず、商業上の実行がなさ

れていない理由の一つは、実際のところ、現実の市販製品での実行が深刻な問題に遭遇しているためだと考えている。

本出願人は、これらの問題の重要な理由の一つは、文献に記載されている多くのAFP類のうち、限られたAFP類のみしか各適用のために適切に使用することができないことにあるということを見出した。また、本出願人は、適するAFP類の選択は、所望の適用及び／又は達成される製品の特性によることを見出した。

国際公開第90/13571号は、化学的又は組換えDNA技術によって製造される不凍ペプチドを開示している。AFP類は、アイスクリームのような食品に、適切に使用することができる。実施例3Bは、ウォーターアイス混合物が0.01重量%のAFPと組み合わせて薄層へ冷凍されるとき、改良された氷結晶形を示す。

国際公開第92/22581号は、アイスクリームでの氷の結晶の生長を制御するために使用することのできる、植物から得られたAFP類を開示している。また、この文献は、植物細胞を破壊することなく、葉に抽出溶媒を浸透させることにより、植物の細胞外隙間からポリペプチド組成物を抽出する方法を記載している。

国際公開第94/03617号は、酵母からのAFP類の製造、及びそのアイスクリームへの使用可能性を開示している。国際公開第96/11586号は、微生物により製造された魚のAFP類を記載している。

本発明は、上記の問題の解決法を提供することを目的とする。特に、本発明は、砕け易いが比較的軟らかい冷凍食品であって、砕け易さが低温での延長された貯蔵において維持される冷凍食品を提供することを目的とする。

驚くべきことに、AFP類を簡便に冷凍食品へ組み入れ、氷の結晶形が特定の要求を満たすように加工条件を変更すれば、所望の製品特性を得ることが可能であることが発見された。

したがって、第一の観点では、本発明は、AFPを含む冷凍食品の製造方法に関し、その条件は、製品中の氷結晶が1.1乃至1.9の縦横比を有するように選択される。

食品が冷凍される場合、氷結晶は製品全体に形成される。AFP類が、冷凍さ

れる食品に含まれる場合、これは、氷の再結晶特性の変化を導くことが可能である。AFPを含む食品の氷結晶の凝集は、製品の噛み応えを導くことができる。

消費者の多くは、アイスクリーム及びウォーターアイスのような比較的軟らかくかつ噛み応えのある食品又は成分を好む。例えば、軟らかいウォーターアイスは、冷凍菓子製品中の魅力的な成分として使用することができ、また、比較的噛み応えのあるアイスクリームは、消費者の大部分に好まれる。

驚くべきことに、本発明者らは、冷凍食品へAFP類を配合すると、その食品が一方で比較的軟らかくしかし噛み応えがあり、他方で改良された氷結晶化特性を維持することを発見した。本出願人は、驚くべきことに、この特性に有利な組み合わせは、製品がAFP類を含み、製品中の氷結晶が1.1乃至1.9の間の縦横比を有する場合に達成されることを見出した。

氷結晶の縦横比は、氷結晶の長さ及び幅の比として定義される。1.1乃至1.9の縦横比は、丸味のある氷の結晶に相当し、細長い形ではない。結晶の縦横比は、いずれかの適する方法で測定することが可能である。好ましい方法は、実施例に記載されている。好ましい比は1.2乃至1.8、最も好ましいのは1.3乃至1.7である。

本発明の冷凍製品は砕け易いことが好ましい。破壊挙動が観察される層の最小限の厚さは、好ましくは10mm未満、より好ましくは1乃至5mmである。破壊挙動は、種々の厚さの層を用意し、破壊挙動が起きる最小限の厚さを測定するか、又は実施例に記載されているように、ヤング率(Young's Modulus)から算出するかのいずれかで測定することができる。

配合及びこれに続く食品の冷凍の間、パラメーターのいくつかは、形成される氷結晶の縦横比に影響する可能性がある。縦横比に影響を与える因子の例を以下に示す。本出願人は、氷結晶の縦横比を所望の範囲内に収めるような条件を選択することは、当業者の能力の範囲内であると考ええる。

氷結晶の縦横比に影響する因子の一つは、製品を冷凍する速度である。一般的には、冷凍速度が増加すると、氷結晶の縦横比は減少する。この点に関し、冷凍温度は、冷凍速度に影響する可能性があり、したがって、氷結晶の縦横比に影響

する可能性がある。この点に関し、例えば、華氏-30度未満の温度での硬化工程を含む冷凍方法が好ましい場合がある。貯蔵温度及び貯蔵時間は、同様に縦横比に影響する可能性があり、貯蔵温度が高いほど、及び／又は貯蔵時間が長いほど、高い縦横比を好ましく形成する傾向にある。

氷結晶の縦横比に影響するもう一つの因子は、冷凍の間の製品の可動性である。例えば、液体のウォーターアイス又はアイスクリームミックスが冷凍される場合、静止した冷凍は、氷結晶のかなり高い縦横比を導き、攪拌するとより低い縦横比を導く。高剪断混合は、さらにより低い縦横比を導く。

氷結晶の縦横比に影響を与えるもう一つ因子は、或る種の成分の存在及び量である。例えば、製品中に網状構造を形成する傾向にある成分（例えばガム又は脂肪）が存在すると、これらの成分を含まない製品中よりも低い縦横比を導く可能性がある。また、他の成分はより低い縦横比を導く可能性があり、例えば、高い糖類含量などの高い固体含量は、低い縦横比を導く。

最後に、存在するAFP類の性質及び量は、縦横比の変化を導く可能性がある。低い縦横比を好んで形成すると思われるAFP類もあるが、より高い縦横比を誘導すると思われるAFP類も存在する。これらのAFP類を選択するのに適するテストは、実施例に記載されている。AFP類の量の変化は、縦横比を変化させる可能性がある。

第二の態様に従うと、本発明は、AFPを含む冷凍食品を製造する方法に関し、配合、冷凍及び貯蔵条件は、製品中の氷結晶が1.1乃至1.9の縦横比を有するように選択する。

本発明の方法は、AFP類を含む冷凍食品のいずれにも用いることができる。適する製品の例は、ソース、ミール（meal）などである。好ましい食品は、アイスクリーム及びウォーターアイスなどの冷凍菓子製品である。

本出願人は、本発明の方法で使用するAFP類は、植物、魚、虫、及び微生物などの種々の原料に由来することができることを見出だした。天然に発生する種

及び遺伝的な改変を経て得られた種の両方を使用することができる。例えば、微生物又は植物はAFP類を発現するように遺伝的に改変することが可能であり、

そのAFP類は本発明の方法に使用することができる。

AFP類を製造するための遺伝的な操作技術は、以下の通りである。適切な宿主細胞又は有機体は、所望のポリペプチドを含む遺伝子構築物により形質転換される。そのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を、転写及び翻訳に必要な要素をコードする適する発現ベクターへ挿入し、適した環境下で発現する（例えば、適切な向き及び正しい読み取り枠で、及び適する標的化及び発現配列で）ようにすることができる。これらの発現ベクターを構築するのに必要な方法は、当業者に周知である。

発現系の多くは、熱安定なポリペプチドコード配列を発現するために使用される。これらは、バクテリア、酵母、昆虫細胞系、植物細胞系、及び植物を含み、全てが適する発現ベクターで形質転換されるが、これらに限定されるものではない。

広範囲の植物及び植物細胞系を、所望のポリペプチドの核酸構築物で形質転換することができる。好ましい態様は、トウモロコシ、トマト、タバコ、ニンジン、イチゴ、菜種、及び砂糖大根を含むが、これらに限定されない。

本発明の目的のために、AFP類は魚に由来するものが好ましい。特に好ましいのは、植物起源のもの（すなわち、植物から直接得られるタンパク質、又は他の有機物から遺伝子工学的に形成されたこれらのタンパク質）、特に冬ライ麦又は多年生の草に由来するものを使用する。

天然に起源するものでは、AFP類は、二つ以上の異なるAFP類の混合物からなることがある。

好ましくは、これらのAFP類は、十分に氷の再結晶を阻害する特性を有するものから選択される。再結晶特性を決定するための適切なテストを、実施例に示す。本発明のAFP類は、再結晶において、好ましくは実施例のように測定して、好ましくは20 μ m未満、より好ましくは5乃至15 μ mの氷の粒子径を提供する。特定の縦横比を有する小さい大きさの氷結晶が、所望の構造特徴を得るのに

特に有利であると考えられている。

本発明の非常に有利な態様は、製品の製造において、静止した冷凍条件を使用するように選択されしかも上記の縦横比を得るような製品の組成配合に関する。

このような食品の例は、雰囲気又は冷凍庫温度で貯蔵することが意図されている、アイスクリームミックス及びウォーターアイスミックスのような冷凍菓子ミックスである。適する製品の形は、例えば、バッグ又はサシェに包装された粉末のミックスである。このミックスは、例えば、水及び任意に他の成分の添加、及び任意に曝気の後、冷凍食品の基礎を形成することができる。

適するミックスのもう一つの例は、必要であれば、さらなる成分の添加及び任意にさらに曝気の後、冷凍することが可能な液体のミックスであり得る。

上記のミックスの明確な利点は、AFP成分が存在することにより、例えば、店又は家庭用の冷凍庫で静止条件下でミックスを冷凍することが可能になったことである。

非常に簡便なことに、これらの混合物は密封された容器（例えば、カートン、バッグ、箱、プラスチック容器など）へ包装される。一つの部分では、包装の大きさは一般に10乃至1000gの範囲である。多様な部分では、500kgまでの包装の大きさが適している。一般に、包装の大きさは10g乃至5000gの範囲である。

上記のように、AFP類が使用される好ましい製品は、アイスクリーム又はウォーターアイスのような冷凍菓子製品である。好ましくはAFP類の含量は最終製品を基にして0.0001乃至0.5重量%である。乾燥ミックス又は濃縮物が使用される場合、最終的な冷凍製品が上記の範囲内であるように、濃度をより高くすることができる。

驚くべきことに、本発明の組成物は、良好な品質のままで非常に少量のAFP類を含むことが見出された。

これまでの一般的な考えは、非常に高濃度のAFP類が、再結晶特性の程よい改良を得るために要求されていた。その理由は、AFP類が氷結晶の表面の十分な部分で作用し、そのため、程よい効果を得るために、例えば0.01重量%以

上のような非常に高濃度で存在する必要があると通常考えられているためである

驚くべきことに、冷凍製品に関し、改良された再結晶特性及び増大された温度耐性は、低濃度のAFP類を使用しても得られることが見出だされた。

驚くべきことに、冷凍菓子製品中の適切な再結晶特性及び温度耐性を提供するのに、AFP類の濃度は0.1乃至50ppm程度に低いことが可能であることが見出だされた。本出願人は、いずれかの理論に捕らわれることを望まないが、この理由は、冷凍菓子の固体とAFP類間の相互作用が、結晶の生長を阻害する卓越した機能を提供するためである可能性がある。最も簡便には、AFPの濃度は1乃至40ppm、特に好ましくは2乃至10ppmである。

本発明の目的に鑑み、冷凍菓子製品という語は、アイスクリーム、フローゼンヨーグルト、シャーベット、ソルベ、アイスマイルク、及びフローゼンカスタードのような牛乳含有冷凍菓子、ウォーターアイス、グラニタ及び冷凍フルーツピューレを含む。冷凍発酵食品でのAFP類の使用があまり好ましくない適用もある。

冷凍菓子中の固体含量は好ましくは30重量%より高く、より好ましくは40乃至70重量%である。

本発明の非常に好ましい態様では、軟らかいが碎け易い冷凍菓子配合物を、氷菓子中の歯応えの対照を生じさせるために使用する。好ましくはこのような氷菓子は、本発明のAFP含有組成物を、その構造中に分離した要素として含む。例えば、比較的固いアイスクリームの芯を本発明の組成物の薄い層で覆うと、アイスクリームの芯を覆う比較的軟らかいが碎け易い外部層が提供される。第二の態様は、本発明の配合物を内包物として氷菓子へ組み込むことである。第三の態様は、本発明の配合物とアイスクリームを相互の層にして、薄く軟らかいが碎け易い層をアイスクリームの層と交互に製造する。

実施例 I

冬ライ麦からのAFP類の分離

冬ライ麦（ハロ（Halo）種）を、1月（この月の平均温度は3.5℃であり、植物は確実に適切な寒冷順化した）に収穫した。さらなる処理のために組織を迅

速に実験室へ輸送し、水で全体を洗浄して汚れを除去した。

刈り取ったもの400gを、雰囲気温度で800gの水とともに、ワーリング (Waring) 混合器で、葉の組織が完全に粉碎されるまで均質化した。AFPに富んだ汁を4層のモスリンを通過させて回収した。

AFPに富んだ汁を次に10分間沸騰させることにより温度処理にさらした。これにより、本発明で使用するAFPを溶液中に維持し、タンパク質の沈殿を生じさせた。15,000gで20分間、遠心分離するか、又はさらにムスリンを通して濾過することにより上清を沈殿から分離した。

AFP類は、凍結乾燥することにより上清から分離できる。

実施例II

草からのAFP類の分離

混合された草組織 (ポア・トリビアルリス (Poa trivialis)、ロリウム・ペレンネ (Lolium perenne)、ホルカス・ラナタス (Holcus lanatus)、及びブロムス・ステリリス (Bromus sterilis)) を、1月 (この月の平均温度は3.5℃であり、植物は確実に適切な寒冷順化をした) に収穫した。さらなる処理のために組織を迅速に実験室へ輸送し、水で全体を洗浄して汚れを除去した。

刈り取ったもの500gを650ワット (W) の電子レンジに配置し、フルパワーで5分加熱し、温度を85℃乃至100℃へ上昇させた。次に草の刈り取ったものを雰囲気温度へ冷却した。

加熱工程の後、AFPに富んだ汁を濾過により刈り取ったものから分離した。同容積の水の存在下で、5分間連続的に全体を攪拌し、次に3層のモスリンを通して絞った。

上清を凍結乾燥してAFPを分離することができる。

実施例III

アイスクリームを製造するためのプレミックスを、以下のものを混合して製造した。

成分	重量%
スキムミルク粉末	11.39

ショ糖	3.14
マルトデキストリン (MD40)	4.00
コーンシロップ 63DE	20.71
バターオイル	9.00
モノグリセリド (パルミチン酸エステル)	0.45
バニリン	0.01
イナゴ豆ゴム	0.07
グアールゴム	0.05
カラゲナン	0.02
微結晶セルロース	0.24
ゼラチン	0.14
A F P (実施例 I * の)	0.01 又はなし (対照)
水	残部

* 記 A F P は、濃縮された溶液として添加する。百分率は A F P の量を示す。

この混合物を簡便に雰囲気温度で例えばプラスチック容器に貯蔵することができる。

混合物を従来の家庭用混合器でホイップし、約 100% のオーバーランにし、家庭用冷凍庫内で静止して冷凍する。

二か月の貯蔵の後、本発明の組成物は、対照サンプルよりも著しく良好な砕け易さを有した。

実施例 IV

アイスクリームを製造するための液体プレミックスを、以下の成分を混合して製造した。

成分	重量%
スキムミルク粉末	10.00
ショ糖	13.00
マルトデキストリン (MD40)	4.00
イナゴ豆ゴム	0.14

バターオイル	8.00
モノグリセリド（パルミチン酸エステル）	0.30
バニリン	0.01
A F P（実施例 I I * の）	0.01又はなし（対照）
水	残部

* 記 A F P は、濃縮された溶液として添加する。百分率は A F P の量を示す。

実施例 V

実施例 IV の配合物を冷凍し、70% のオーバーランへ曝気することにより、アイスクリームを製造した。

生成物のサンプルを -18°C でプロラム (Prolan) 環境キャビネット中で約 12 時間平衡させた。薄いガラス板の中央からアイスクリームの薄い層を塗って、顕微鏡のスライドを用意した。

各スライドを、温度制御された (-18°C) 顕微鏡のステージへ移し、氷の結晶の画像 (約 400 個の水結晶) を集め、ビデオカメラを通じて画像の保存及び分析システムへ中継した。

保存された氷結晶の画像は、手動で周辺を描くことによってこれを目立つようにし、それで結晶全体が目立つようになった。次に目立たされた結晶の画像は、最も長い直線 (長さ)、最も短い直線 (幅)、縦横比 (長さ/幅) を完成するのに要求された画素の数を数える画像分析ソフトウェアを使用して測定した。

結晶の平均縦横比が計算された。

対照サンプルでは、縦横比は 1.45 であった。

A F P を含むサンプルでは、縦横比は 1.7 であった。

実施例 VI

実施例 IV のアイスクリームの砕け易さを、アイスクリームの破壊挙動を計算して測定した。3 点曲げテスト (3-Point bend test) を使用して、ヤング率を計算した。

ヤング率は、アイスクリームの細長い片を用意し、18 時間冷凍キャビネットで平衡させ、温度キャビネットへ移動させることにより測定した。R. P. Brown 編

集、Handbook of Plastics Test Methods (第2版) (George Godwin Ltd、1981年)に記載されたように、細長い片を3点曲げ装置 (rig) に配置した。サンプルのテストは、50 mm/分の変形速度ですぐに実施された。カー変形曲線から、初期の傾きが測定され、これは、以下の等式

$$\text{ヤング率 (Pa)} = \frac{\text{傾き} \times L}{4 \times B \times W}$$

(式中、L = ビーム間隔 (110 mm)、B = サンプルの幅、W = サンプルの高さである) にしたがってヤング率を計算するのに使用された。通常、8つのサンプルをテストして平均ヤング率値を得た。

Williams及びCawood著、Polymer Testing 9 15頁乃至26頁 (1990) に記載された計算を使用して、破壊強さを計算することができる。

結果は以下の通りであった。対照サンプルでは、966 mの厚さが、砕け易い層を得るのに必要であると計算された。AFPを含むサンプルでは、砕け易さ (破壊挙動) は、3 mmの厚さですで見受けられた。これは、明らかに、本発明の製品の改良された砕け易さを示す。AFPを有する製品は、比較的固かった。

実施例VII

この実施例は、本発明で好まれる氷結晶の形の形成に好ましいAFP類を選択するための方法を記載する。

通常的环境下での氷結晶の生長は、結晶のa軸に沿う。AFP類が存在する場合、生長は変化する。この結晶の形の選択的影響は、AFP類が氷の結晶の特定の部分に結合する傾向にあるという事実、及び特定の方向での氷の結晶の生長を阻害することによって説明することができる。結合は、例えば、柱状面 (プリズム形平面 (prism planes)、a軸に垂直) 又は錐面 (ピラミッド形平面 (Pyramidal planes)、これらの平面から突き出ている) で生じることができる。

出願人は、本発明の縦横比を形成するのに好ましいAFP類は、錐面へ結合する傾向にあるAFP類を選択することによって見つけられることを見出した。特定の結合をするこれらのAFP類を選択する方法は、いずれの適する方法でもよい。適するテストは、Knight C.A.、C.C.Cheng、及びA.L.DeVries、Biophys.J

.59 (1991) 409 頁乃至 418 頁、Adsorption of α -helical antipeptides on specific ice crystal surface planesに記載された技術を基に、いわゆる「氷の単結晶の『半球体』生長実験」("Single ice crystal 'hemisphere' growth experiment") を使用する。

完全に遮断された 5 l のプラスチックビーカーを脱イオン水で満たし、 -1°C に温度制御されたキャビネットに配置した。次に、上部から徐々に冷凍した。2 日後、約 4 cm の厚さの氷の単結晶がビーカーを覆った。この結晶の結晶学的な配向は、単結晶 X 線回折法を使用して測定した。約 2 cm の大きさの氷の立方体を、一つの表面が柱状面と平行になるように、そして他は底面と平行になるように大きな単結晶から切り出した。したがって、方向付けられた氷の単結晶が製造された。

真鍮の冷却されたフィンガー（直径約 1 cm）からなる装置を使用し、その上に配向された種結晶が冷凍された。種結晶が種の回りにくっつくように、種を初めにくりぬいた。次に冷却剤をフィンガーを通して循環させ、種が凍結してフィンガーにしっかりとくっついた。

次に、種結晶を有するフィンガーを、観察下の物質の溶液を含む、遮断された 100 ml のビーカーに浸した。溶液の初期温度は室温（ $\sim 18^{\circ}\text{C}$ ）であり、冷却されたフィンガーのみが冷却をもたらした。最初に種結晶は部分的に融解したが、次に単結晶の半球体が生長した。数時間後（6 乃至 8）、直径 5 乃至 7 cm

の半球体が形成された。

実験は種々の AFP 溶液で実施された。使用した AFP 溶液は 10^{-3} mg/ml の濃度を有した。

次に半球体を冷却されたフィンガーから除去し、 -15°C に温度制御されたキャビネットへ移動させた。表面を引っ掻き、少なくとも一晚（16 時間以上）キャビネット内に放置した。インテグラル・ファン (integral fan) によりキャビネットを通して空気を循環させた。この間、氷の表面層の蒸発が起きた。したがって、氷の半球体の表面は、滑らかで鏡のような表面になった。しかし、AFP を含む半球体では、粗い斑点が表面に見られる。これらは、AFP が半球体の表

面に結合した斑点に相当する。大きいAFP分子は、氷分子が蒸発するのを防ぎ、氷への優先的な結合が起きた表面で、AFP分子の粗いマット(mat)が表面上に形成される。半球体の配向は知られており、これらの粗い斑点と底面及び柱状面方向への角距離は光学角度計で容易に測定できるので、結合平面の性質を容易に決定することができる。

このテストは、錐面へ結合する傾向のあるAFP類を選択するために使用される。例えば、実施例I及びIIのAFP類は、錐面へ結合する傾向にある。又、植物抽出物の多くが、結果的に錐面へ結合する傾向にある。

上記のテストを、氷結晶の高い縦横比を好ましく形成する傾向にあるAFP類を決定するために使用することは、当業者の能力の範囲内である。本発明の冷凍食品での適性をテストするために、実際の製品が製造され、製品中の結晶の縦横比を決定することができる。

実施例VIII

再結晶での氷結晶の大きさを測定するテスト

AFPを含む水溶液のサンプルを30重量%のショ糖含量へ調節する(サンプルの初期濃度が30%より高い場合、希釈によって行い、初期濃度が低い場合、ショ糖を添加して30%の濃度へ調節する)。

一般に、テストは、AFP及び水を含む適する組成物のいずれかへ適用することができる。一般に、テスト組成物のAFPレベルは、あまり重要ではなく、例えば、0.0001乃至0.5重量%、より好ましくは0.0005乃至0.1重量%、最も好ましくは0.001乃至0.05重量%、例えば、0.01重量%である。

サンプルの3 μ lの滴を22mmのカバースリップへ配置する。次に、直径16mmのカバースリップを上に乗せ、200gの重りをサンプルの上に乗せ、スライドの厚みを均一にする。カバースリップの端を透明なネイル・マニキュアで塞ぐ。

スライドをリンカーム(Linkham)THM600の温度制御された顕微鏡のステージへ置く。ステージは、-40℃まで急速に冷却され(一分当たり50℃)

、多数の小さい結晶を生じる。次に、ステージの温度を -6°C まで急速に上昇させ（1分当たり 50°C ）、この温度を維持する。

氷相を -6°C でライカ・アリストプラン（Leica Aristoplan）顕微鏡を使用して観察した。ラムダ平面に分極光の条件を使用して氷の結晶の対比を促進させた。氷相の状態（氷の結晶の大きさ）は、 $T=0$ 及び $T=1$ 時間で 35 mm の顕微鏡写真で記録する。それにより、 $20\text{ }\mu\text{ m}$ 未満、より好ましくは 5 乃至 $15\text{ }\mu\text{ m}$ の平均粒子径（肉眼測定、数平均）は、本発明の製品に使用するのに好ましいAFP類を示す。

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成10年8月12日（1998. 8. 12）

【補正内容】

請求の範囲

1. 不凍ポリペプチドを含む冷凍食品の製造方法であって、食品中の氷結晶が1.1乃至1.9の縦横比（幅で割った長さとしてことにより定義される）を有するように条件を選択する、方法。
2. 縦横比に影響する条件が、冷凍速度、冷凍の間の製品の可動性、貯蔵温度及び時間、製品の配合及び不凍ポリペプチドの性質及び量、及びこれらの組み合わせから選択される、請求項1記載の方法。
3. 冷凍食品が冷凍菓子製品である、請求項1記載の方法。
4. 0.0001乃至0.5重量%の不凍ペプチドを含む冷凍菓子製品であって、前記冷凍菓子製品が1.1乃至1.9の縦横比の氷結晶を有する、冷凍菓子製品。
5. 不凍ポリペプチドが氷結晶の錐面へ好ましく結合する、請求項4記載の冷凍菓子製品。
6. 噛み応えの対比を有する冷凍菓子製品であって、前記冷凍菓子製品が、請求項4記載の冷凍菓子製品の分離要素を含む、冷凍菓子製品。
7. 薄いウォーターアイス層と交互に薄いアイスクリーム層を含み、ウォーターアイス層が、0.0001乃至0.5重量%の不凍ポリペプチドを含み、1.9乃至3.0の縦横比の氷結晶を有する、請求項6記載の冷凍菓子製品。
8. 請求項4記載の冷凍菓子製品の製造に使用するのに適するアイスクリーム・ミックス。
9. 製造に曝気及び静置冷凍を含む、請求項8記載のアイスクリーム・ミックス。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 97/03636

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A23G9/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A23G		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 22581 A (M. GRIFFITH) 23 December 1992 cited in the application see page 30, line 20-30	1-4, 6
Y	see page 21, line 11 - page 22, line 17; figures 6, 8	5 8, 9
Y	WO 91 10361 A (B. RUBINSKY ET AL.) 25 July 1991 see page 13, line 2 - line 20 see page 24, line 21 - page 25, line 3	5
Y	WO 95 20883 A (G. S. CARRICK ET AL.) 10 August 1995 see page 5, line 15 - page 6, line 9; claims; examples	8, 9
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 November 1997		Date of mailing of the international search report 04/12/1997
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5318 Patensaan 2 NL - 2200 HW Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fac. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Guyon, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 97/03636

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	P.J. LILLFORD ET AL.: "Antifreeze proteins" JOURNAL OF FOOD ENGINEERING, vol. 22, 1994, GREAT BRITAIN, pages 475-482, XP002047525 see page 480, line 30 - line 38 ---	1,5
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 18, no. 537 (C-1260), 13 October 1994 & JP 06 189686 A (SATO NORIO ET AL.), 12 July 1994, see abstract ---	1
A	US 3 897 571 A (B. HOMLER ET AL.) 29 July 1975 see column 1, line 40-57 see column 2, line 45 - column 3, line 36 ---	1
Y	R. E. FEENEY ET AL.: "ANTIFREEZE PROTEINS" FOOD TECHNOLOGY, vol. 47, no. 1, January 1993, CHICAGO, pages 82-90, XP002022179 see page 84, column 2 - page 85, column 1; figures 4,5 see page 87, column 1 - column 2 ---	1-4,6,8, 9
Y	W. S. ARBUCKLE: "ICE CREAM" 1987, THE AVI PUBLISHING COMPANY, 4TH. EDITION 1987 XP002022180 see page 232, line 1 - page 238 see figures 12.1,12.4 ---	1-4,6,8, 9
A	WO 96 11586 A (G. FLETCHER ET AL.) 25 April 1996 cited in the application ---	
A	WO 96 16557 A (COX D. R. G. ET AL) 6 June 1996 see page 4, line 12 - page 5, line 15 see page 6, line 25 - page 8, line 13 ---	1,9
A	US 4 500 553 A (L. G. LIGGETT ET AL.) 19 February 1985 see column 2, line 59-63 see column 3, line 41-54 ---	1
A	GB 2 075 326 A (EIJI ITOH ET AL.) 18 November 1981 ---	
A	EP 0 037 205 A (TOPALIAN H. H. ET AL.) 7 October 1981 ---	
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 97/03636

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 565 643 A (SOICHI ARAI ET AL.) 21 January 1986 see column 3, line 4 - column 4, line 5 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Appl. No.

PCT/EP 97/03636

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9222581 A	23-12-92	AU 1907192 A	12-01-93
		CA 2110510 A	23-12-92
		EP 0589928 A	06-04-94
WO 9110361 A	25-07-91	AU 659795 B	01-06-95
		AU 7335491 A	05-08-91
		EP 0511317 A	04-11-92
		JP 8009521 B	31-01-96
		JP 5503706 T	17-06-93
		US 5358931 A	25-10-94
		WO 9212722 A	06-08-92
WO 9520883 A	10-08-95	AT 147588 T	15-02-97
		AU 681008 B	14-08-97
		AU 1664495 A	21-08-95
		CA 2182703 A	10-08-95
		CN 1140394 A	15-01-97
		CZ 9602273 A	15-01-97
		DE 69500136 U	27-02-97
		DE 69500136 T	07-05-97
		EP 0710074 A	08-05-96
		ES 2085847 T	16-06-96
		FI 963037 A	01-08-96
		HU 74498 A	28-01-97
		JP 9506780 T	08-07-97
		NO 963243 A	02-08-96
		NZ 279495 A	24-02-97
		PL 315787 A	09-12-96
		SK 100796 A	04-12-96
		ZA 9500746 A	31-07-96
US 3897571 A	29-07-75	NONE	
WO 9611586 A	25-04-96	US 5676985 A	14-10-97
		AU 3602395 A	06-05-96
		EP 0785727 A	30-07-97
WO 9616557 A	06-06-96	AU 3988295 A	19-06-96
		EP 0804085 A	05-11-97
		FI 972276 A	29-05-97

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/03636

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9616557 A		NO 972465 A	29-05-97
		US 5633029 A	27-05-97
US 4500553 A	19-02-85	NONE	
GB 2075326 A	18-11-81	JP 1213229 C	27-06-84
		JP 56158055 A	05-12-81
		JP 58049145 B	02-11-83
EP 37205 A	07-10-81	US 4297379 A	27-10-81
US 4565643 A	21-01-86	JP 1769621 C	30-06-93
		JP 4058516 B	17-09-92
		JP 60226588 A	11-11-85
		CA 1218260 A	24-02-87

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 ニードハン、デイビット

英国、シャーンブロック・エムケイ44・1
エルキュー、ユニリーパー・ハウス、ユニ
リーパー・リサーチ・コロワース・ラボラ
トリー (番地なし)

(72)発明者 スモールウッド、キース

英国、シャーンブロック・エムケイ44・1
エルキュー、ユニリーパー・ハウス、ユニ
リーパー・リサーチ・コロワース・ラボラ
トリー (番地なし)